

Противоопухолевые и противовирусные пептиды**Область техники**

Предлагаемое изобретение относится к пептидам и белкам
5 противоопухолевого и противовирусного действия, а также к лекарственным
средствам на их основе.

Предшествующий уровень техники

Известны противоопухолевые пептиды из группы блеомицина (1).
10 Блеомицины оказывают прямое цитотоксическое действие на опухолевые
клетки, однако возможности их применения в клинике ограничены
выраженными побочными эффектами, прежде всего со стороны легких и почек.
Известно применение рекомбинантных белков из группы интерферонов в
качестве активаторов противоопухолевого иммунитета и ингибиторов
15 пролиферации опухолевых клеток. Интерфероны применяются для лечения
множественной миеломы (2), болезни Ходжкина (3), миелоидной лейкемии (4).
Однако высокая стоимость интерферонов делает их малодоступными для
широкого клинического применения. Другим ограничением служат побочные
эффекты, связанные с возможной пирогенностью, иммуногенностью и другими
20 нежелательными свойствами рекомбинантного интерферона.
Известны предложения по использованию пептидных индукторов апоптоза в
качестве потенциальных противоопухолевых препаратов (5). Однако
клинические перспективы этого направления остаются неизученными. В
настоящее время на стадии разработки и клинических испытаний в качестве
25 противоопухолевых средств находится ряд белковых препаратов цитокиновой
природы (6). Наибольшую известность получило использование интерлейкина-
2, однако высокая токсичность и стоимость рекомбинантного интерлейкина-2
ограничивают его применение в широкой онкологической практике.
Известно применение белков гемоцианинов и арилфоринов в качестве
30 активаторов иммунного ответа и противоопухолевых агентов (7).
Несмотря на наличие перечисленных выше и других разработок, описанных в
литературе, терапия онкологических заболеваний во многих случаях остается
малоэффективной и практически всегда высокотоксичной и дорогостоящей.

Поэтому поиски новых подходов к терапии опухолей остаются одной из наиболее острых проблем современной медицины.

Известны иммуномодулирующие пептиды - аллофероны (8). Основной областью применения аллоферонов является лечение вирусных инфекций. В то же время
5 имеются сведения о противоопухолевых свойствах аллоферонов, основанных на активации механизмов противоопухолевого иммунитета - интерферонов и естественных киллеров (9). Аллофероны являются наиболее близкими аналогами предлагаемого изобретения по химической структуре и механизму действия.

10. Раскрытие изобретения

Экспериментальные исследования противоопухолевой активности аллоферона показали, что заявляемый пептид подавляет рост сингенного опухолевого трансплантата у мышей и на этом основании может быть отнесен к перспективным противоопухолевым препаратам. Эффект аллоферона
15 реализуется на уровне системного ответа организма на трансплантированную опухоль. В то же время на клеточном уровне влияние аллоферона на пролиферацию опухоли оказывается более сложным. В частности, эксперименты *in vitro* показали, что аллоферон, в зависимости от концентрации в культуральной среде, может как ингибировать (в области высоких концентраций), так и
20 стимулировать (в области низких концентраций) пролиферацию опухолевых клеток. Наличие ростстимулирующей активности ограничивает возможности использования аллоферона для терапии опухолей, где подавление пролиферации малигнизированных клеток является основной целью лечения.

Задачей настоящего изобретения является разработка препаратов, которые, сохраняя иммуномодулирующий механизм действия аллоферона, в то же время
25 обладали бы сниженной ростстимулирующей активностью и повышенной антипролиферативной и цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток.

С этой целью разработано новое семейство пептидов, отличающихся от аллоферонов и других биологически активных соединений структурой,
30 механизмом действия и достигаемым терапевтическим эффектом.

Предлагаемая группа соединений относится к линейным пептидам, строение которых описывается следующей структурной формулой:



где X_1 отсутствует, либо содержит не менее 1 аминокислоты,

X_2 отсутствует, либо содержит не менее 1 аминокислоты.

При разработке настоящего изобретения в качестве базовой структуры был использован пептид, представленный в Таблице 1 под названием аллостатин 1

5 (SEQ ID NO 1). Аллостатин 1 был синтезирован методом твердофазного синтеза и использован для изучения биологической и терапевтической активности предлагаемых пептидов. Исследования, результаты которых суммированы в приведенных ниже примерах, показали, что данный пептид обладает противоопухолевой активностью, основанной на прямом подавлении

10 пролиферации опухолевых клеток и усилении определенных звеньев противоопухолевого иммунитета.

Компьютерный анализ баз данных по структуре и свойствам белков и пептидов установил, что данное соединение относится к новому неизвестному ранее семейству биологически активных пептидов. Оригинальная структура

15 предлагаемых пептидов обеспечивает достижение нового технического уровня - возможности эффективного подавления опухолевого роста и лечения на этой основе онкологических заболеваний.

Анализ гомологии аминокислотных сиквенсов аллостатина 1 и известных белков и пептидов, выполненный при помощи программы Blast search по материалам базы данных Swissprot, выявил ряд структурных аналогов

20 предлагаемых пептидов. Эти данные суммированы в Таблице 1.

Выявленные сиквенсы с высоким уровнем гомологии по отношению к аллостатину 1 принадлежат к однородной с точки зрения структуры, функций и происхождения группе соединений - прионовым белкам (PrP). Прионовые

25 белки (прионы) продуцируются клетками различной тканевой принадлежности многих видов животных, в том числе человека и других млекопитающих. Функции прионов в норме остаются малоизученными. В то же время известно, что при определенных условиях прионы могут претерпевать конформационные изменения, в результате которых возникает патологическая изоформа scrapie,

30 ответственная за развитие некоторых нейродегенеративных заболеваний. Зрелый прионовый белок обычно содержит более 200 аминокислотных остатков. Патологические свойства прионов связаны с фрагментами, гомологичными фрагменту 114-134 PrP I быка, в особенности амилоидному гидрофобному участку AGAAAAGA этого фрагмента (10). Аллостатин 1

гомологичен повторяющимся участкам 64-75, 72-83, 80-91, 87-98, 96-108 и структурно совершенно отличен от участка 114-134 PrP I. Тесное структурное сходство этих участков и предлагаемых пептидов (например, в участке 96-108 PrP I быка совпадают с аллостатином 11 аминокислот из 13 или 84%)

5 предполагает и сходство биологической активности. Поэтому с высокой степенью вероятности можно предположить, что фрагменты прионов млекопитающих, гомологичные предлагаемым противоопухолевым пептидам, также обладают сходной противоопухолевой активностью. Механизм вероятного противоопухолевого действия этих фрагментов неизвестен, однако

10 есть данные, согласно которым прионы имеют отношение к регуляции активности Т-лимфоцитов (11). Т-лимфоциты, в свою очередь, играют ключевую роль в реакциях противоопухолевого иммунитета.

Структурно-функциональное сходство с фрагментами прионов млекопитающих позволяет выделить потенциально переменные участки сиквенса

15 предлагаемых пептидов, в которых замена состава и порядка следования аминокислот не окажет существенного влияния на функциональные свойства молекулы в целом. С учетом распределения переменных и консервативных участков аминокислотных последовательностей, приведенных в Таблице 1, общая структурная формула (1) включает две переменные зоны X_1 и X_2 ,

20 разделенные консервативной последовательностью из аминокислот триптофана, глицина и глутамина (Trp-Gly-Gln). Переменный участок X_1 может отсутствовать или содержать до 5 и более аминокислот. Переменный участок X_2 может отсутствовать или содержать до 7 и более аминокислот. При этом предлагаемые пептиды могут входить в состав более крупных

25 аминокислотных последовательностей в качестве функционально важной части других полипептидов и белков, например прионовых белков с длиной цепи до 250-300 аминокислот.

Соединения предлагаемой структуры, представленные аллостатином 1, синтезированы с использованием твердофазного метода синтеза и

30 охарактеризованы методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс спектрометрии. Они могут быть получены в виде эфиров, солей, амидов или иных фармацевтически приемлемых производных. Помимо химического синтеза, предлагаемые пептиды можно получать методами генной инженерии или извлекать их из природных источников.

Другими структурными аналогами предлагаемых пептидов являются аллофероны, общая структурная формула которых дана в патенте (12). Результаты сравнительного анализа структурных формул аллоферонов и предлагаемых пептидов, аллостатинов, приведены в Таблицах 2 и 3. В Таблице 2 сопоставлена структура аллоферона 1 (SEQ ID NO 12) и аллостатина 1 (SEQ ID NO 1), двух характерных представителей сравниваемых семейств пептидов. Из сравнения видно, что эти пептиды различаются аминокислотами в позициях 6 и 11, представленных у аллоферона 1 гистидином и валином, а у аллостатина 1 триптофаном и треонином, соответственно. Позиции 6 и 11 составляют неизменную часть и характерный признак всех аллоферонов согласно патенту России № 2172322. Замена аминокислот в этих позициях на триптофан и треонин приводит к желаемому изменению биологической активности и терапевтического эффекта, как показано в приведенных ниже примерах. Сопоставление общих структурных формул (Таблица 3) показывает, что состав консервативных участков и расположение переменных участков в составе молекулы аллостатинов и аллоферонов качественно различаются. На этом основании они могут быть отнесены к двум разным семействам пептидов.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

20 Пример 1. Синтез аллостатина 1

Пептид, состоящий из 13 аминокислот, соответствующих структуре аллостатина 1, был синтезирован методом твердофазного синтеза на автоматическом многоканальном синтезаторе MultisynTech GmbH Witten с использованием Fmoc-(N-[9-флуоренил] метоксикарбонил)-замещенных аминокислот. Очистка синтезированного пептида производилась методом обратнoфазной ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu LC8 с колонкой Chromasil C18, 10 мм. Чистоту полученного пептида контролировали также методом ВЭЖХ (Фиг. 1). Корректность синтеза подтверждена масспектрометрически методом MALDI-TOF на приборе Finnigan TSQ 7000 (Фиг. 2). Экспериментально установленная масса пептида соответствует расчетной, различия находятся в пределах ошибки измерения.

Пример 2. Влияние аллостатина на пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*

Целью экспериментов, изложенных в настоящем разделе, является сравнительный анализ влияния аллостатина и аллоферона на пролиферацию опухолевых клеток.

Сравнивали эффект аллостатина 1 и аллоферона 1 в концентрациях 0.001, 0.01, 0.1, 1 и 10 мкг/мл на пролиферативную активность в массовой культуре опухолевых клеток линии Р388Д1. В лунки 24-луночных планшетов высевали по 5000 клеток, суспендированных в 2 мл среды RPMI 164. В опытах использовали среду, содержащую 5% фетальной сыворотки телят производства фирмы «Биолот». Препараты вносили в лунки в 0.2 мл той же среды сразу после посева клеток, в контроле вносили эквивалентное количество среды без препаратов. Количество клеток в 1 мл инкубационной среды определяли с помощью камеры Горяева. На основе 3-х независимых определений рассчитывали среднее количество клеток в 1 мл инкубационной среды через 21, 44, 90 и 114 часов после начала опыта.

На Фиг. 3 представлена характерная картина влияния аллостатина и аллоферона на динамику роста популяции опухолевых клеток. В качестве критерия оценки антипролиферативной активности препаратов здесь выбрана величина кратности роста популяции за 90 часов наблюдения, определяемая как соотношение количества клеток на лунку в начале и конце периода инкубации. За этот период в контроле количество клеток возросло примерно в 30 раз. В присутствии препаратов количество клеток и, соответственно, скорость пролиферации снижались дозозависимым образом. При этом аллостатин в диапазоне концентраций 0.001-1 мкг/мл в 3-7 раз превосходил аллоферон по антипролиферативной активности. Аллостатин в концентрации 10 мкг/мл практически полностью прекратил рост популяции опухолевых клеток в наблюдаемый период.

Таким образом, данный пример демонстрирует наличие у аллостатина антипролиферативной активности и его преимущество в этом отношении по сравнению с аллофероном.

Пример 3. Взаимодействие аллостатина и противоопухолевых цитостатиков *in vitro*

В этом примере приведены материалы, демонстрирующие взаимодействие аллостатина и классического цитостатика, циклофосфида, в отношении подавления клоногенной активности опухолевых клеток. Показатель клоногенной активности позволяет определить, какая доля опухолевых клеток из общего пула способна давать жизнеспособные клоны и таким образом участвовать в росте и распространении опухоли. Основная цель хемотерапии состоит в уничтожении

именно этих активно пролиферирующих клеток.

Методика постановки эксперимента состояла в следующем. Клетки лимфоидной неоплазмы мыши линии P388Д1 культивировали в среде RPMI 1640, содержащей глутамин, гентамицин и 10% эмбриональной сыворотки телят «High clone». При постановке опыта в ячейки 24-луночных культуральных планшетов вносили по 100 клеток P388Д1 в 1 мл среды указанного состава. Сразу после этого в лунки вносили по 0,1 мл среды без проверяемых препаратов (контрольные лунки) или с препаратами. Каждый вариант опыта был поставлен в трех независимых повторностях. Количество клонов подсчитывали через 7 дней после начала культивирования.

Как видно из Таблицы 4, в условиях данного эксперимента около 15% опухолевых клеток образовали жизнеспособные клоны. Ни циклофосфамид, ни аллостати́н, взятые в отдельности, не оказали заметного влияния на процесс клонирования. В то же время их сочетание существенно снизило клоногенную активность опухолевых клеток, пропорционально дозе аллостати́на.

Настоящий пример показывает, что аллостати́н имеет перспективы использования в комбинированной химиотерапии опухолей в сочетании с цитостатиками типа циклофосфамида.

Пример 4. Противоопухолевое действие аллостати́на на модели перевивных опухолей у мышей

Лабораторным мышам линии DBA-1 подкожно прививали по 3000 опухолевых клеток сингенной линии P388Д1. На следующий день животные были разделены на 4 экспериментальные группы. В первой группе они получали только аллостати́н подкожно в дозе 25 мкг на 4, 11 и 18 сутки после трансплантации опухолевых клеток; во второй группе комбинацию цитостатиков циклофосфамида (0.56 мг), доксорубицина (0.036 мг) и винкристина (1.05 мкг) в день трансплантации, через 7, 14 и 21 сутки; в третьей группе аллостати́н и комбинацию цитостатиков по той же схеме. В четвертой группе (контроль) животным в те же сроки вводили растворитель (0.9% NaCl).

В контрольной группе пальпируемые опухоли в месте трансплантации клеток начали появляться через 20 дней, через 25 дней все мыши имели типичные подкожно расположенные опухоли размером от 5 до 26 мм в диаметре (Фиг. 4). В группах, получавших отдельно аллостати́н или цитостатики, опухоли появлялись с

задержкой, у небольшой части животных опухоли не сформировались на протяжении всего срока наблюдения. В то же время сочетание аллостатина и цитостатиков обеспечило резкое и во многих случаях необратимое противоопухолевое действие. В этой группе только у 40% мышей сформировались опухоли в течение периода наблюдения ($P < 0.001$ по отношению к контролю и $P < 0.05$ по отношению к группе, получавшей только цитостатики).

Данный пример, как и пример 3, свидетельствует, что аллостатин оказывает выраженное противоопухолевое действие при применении в сочетании со средствами стандартной химиотерапии, широко используемыми при лечении лейкозов и других онкологических заболеваний.

Пример 5. Иммуномодулирующая (интерфероногенная) активность аллостатина

Аллофероны относятся к иммуномодуляторам, механизм действия которых связан с индукцией синтеза интерферонов лейкоцитами крови (9). Одна из целей настоящего изобретения состояла в сохранении иммуномодулирующего действия в спектре биологической активности аллостатинов. Настоящий пример иллюстрирует иммуномодулирующую активность аллостатина 1 на модели индукции синтеза интерферона лейкоцитами человека *in vitro*.

Образцы донорской крови смешивали с водным раствором испытуемого препарата и культуральной средой в отношении 1:1:8. Конечная концентрация препаратов в инкубационной смеси составляла 0 (контроль), 0.01, 0.1, 1 или 10 мкг/мл в различных вариантах опыта. Эту смесь инкубировали в течение 24 часов при 37°C в CO₂ термостате. Затем клетки крови были осаждены центрифугированием. После этого сериальные разведения полученного супернатанта были помещены в лунки 96-луночного планшета, содержащие монослой тест-культуры клеток L-41, и проинкубированы 24 ч в тех же условиях. Затем монослой клеток был инфицирован вирусом везикулярного стоматита в дозе, равной 100 ЦПД₅₀ (доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя) и проинкубирован 18ч при 37°C. Затем клетки были окрашены 0.1% раствором красителя кристаллин фиолетовый. Доля разрушенного вирусом монослоя была определена путем измерения оптической плотности экстрагированного красителя при длине волны 590 нм. Полученные значения сравнивались с эффектом референс-препарата интерферона-альфа и полученный титр интерферона рассчитывался в единицах (МЕ) антивирусной

активности интерферона-альфа. На Фиг. 5 суммированы результаты исследования образцов крови 6 доноров, взятые в двух аналитических повторностях (всего 12 определений для каждой точки).

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что интерферогенная
5 активность аллостатина и аллоферона существенно не различается. Следовательно, аллостатин, приобретая специфические свойства, полезные для его применения в качестве противоопухолевого препарата, в то же время сохраняет присущую
10 аллоферону иммуномодулирующую активность. На этом основании аллостатин может быть использован в онкологии и других областях, где это может быть
15 полезно) в качестве препарата двойного действия: прямого (цитотоксический и антипролиферативный эффект, потенцирование эффекта цитостатиков) и опосредованного (иммуномодулирующего).

Пример 6. Антивирусная активность аллостатина

15 В исследованиях противовирусного действия аллостатина в качестве модели использовали летальную гриппозную инфекцию у беспородных белых мышей обоего пола массой 14-16 г. В работе использовали вирус гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), адаптированный к белым мышам. Аллостатин и аллоферон растворяли в дистиллированной воде и вводили животным по 0,25 мл подкожно из расчета 25
20 мкг на мышь (1,5 мг/кг веса). В качестве плацебо в контрольной группе вводили дистиллированную воду. Для определения противовирусной активности препаратов использовали профилактическую схему введения – однократное
25 введение препаратов за 24 часа до заражения. Вирус вводили животным интраназально под легким эфирным наркозом в дозе 3 и 30 LD₅₀. В каждую группу наблюдения брали по 10 мышей. Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 дней. Фиксировали смертность животных в контрольных и опытных группах.

Результаты эксперимента представлены в Таблице 5. Оба препарата обеспечивали одинаково эффективную защиту от летальной гриппозной инфекции у мышей.

30 Таким образом, аллостатин сохраняет антивирусную активность, характерную для аллоферона. На этом основании можно предполагать, что аллостатин может быть использован в качестве антивирусного средства, как и аллоферон. При этом наиболее целесообразно его применение вместо аллоферона в случае пограничных состояний, объединяющих вирусную и онкологическую патологию, например при

опухолях вирусной этиологии или для лечения вирусных заболеваний у онкологических больных.

Лучший вариант осуществления изобретения

- 5 Заявленный противоопухолевый и противовирусный пептид представлен как лучший вариант в примере 1, поскольку он наиболее полно раскрывает терапевтическую эффективность опробованного в лабораторных условиях основы для получения таких препаратов из числа данного класса пептидов, который представляет собой пептид, состоящий из 13 аминокислот, соответствующих структуре аллостатиона 1.
- 10 Пептид был синтезирован методом твердофазного синтеза на автоматическом многоканальном синтезаторе Multisyntech GmbH Witten с использованием Fmoc-(N-[9-флуоренил] метоксикарбонил)-замещенных аминокислот. Очистка синтезированного пептида производилась методом обратнофазной ВЭЖХ на хроматографе Shimazu LC8 с колонкой Chromasil C18, 10 мм. Чистоту полученного
- 15 пептида контролировали также методом ВЭЖХ (Фиг. 1). Корректность синтеза подтверждена масспектрометрически методом MALDI-TOF на приборе Finnigan TSQ 7000 (Фиг. 2). Экспериментально установленная масса пептида соответствует расчетной, различия находятся в пределах ошибки измерения.

20

Промышленная применимость

- Промышленная применимость заявленного изобретения подтверждается результатами лабораторных исследований и расчетов, которые отражены в примерах 1-6 и приведенных ниже таблицах 4 и 5. Эти материалы показывают,
- 25 что применение аллостатиона позволяет подавлять пролиферацию опухолевых клеток и их элиминацию системой иммунологического надзора организма, что является основной целью терапии и профилактики онкологических заболеваний. Сходным образом приведенные материалы свидетельствуют о применимости изобретения для терапии вирусных инфекций путем стимуляции
- 30 механизмов противовирусного иммунитета. Описанный в материалах заявки метод синтеза заявленных пептидов доступен масштабированию в промышленных условиях.

Таблица 1. Гомология сиквенса предлагаемого пептида и прионовых белков млекопитающих.

SEQ ID NO 11 PrP Human f 85-97	SEQ ID NO 10 PrP Human f 69-83	SEQ ID NO 9 PrP Human f 52-66	SEQ ID NO 8 PrP bovin f 64-75	SEQ ID NO PrP bovin f 96-108	SEQ ID NO 6 PrP2 Trast f 88-100	SEQ ID NO 5 PrP2 Trast f 72-83	SEQ ID NO 4 PrP2 Trast f 64-75	SEQ ID NO 3 PrP1 Trast f 96-108	SEQ ID NO 2 PrP1 Trast f 80-91	SEQ ID NO 1 Алюста тин 1
His	His	Gln	His	His	His	His	His	His	His	His
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Gly	Gly	Gly
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Val
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly			Gly		Ser
		Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
	Pro	Pro	Pro			Pro	Pro		Pro	
Gly	His	His	His	Gly	Gly	His	His	Gly	His	His
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Gly	Gly
Gly	Gly	Gly								
Thr	Gly	Gly		Thr	Thr			Thr		Thr
His	Trp	Trp	Gly	His	His	Gly	Gly	His	Gly	His
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly

Цикло фосфа мид	1,5 мкг/мл	12	19	14	$15,0 \pm 2,1$
Алло- статин	0,1 мкг/мл	21	20	14	$18,3 \pm 2,2$
	1 мкг/мл	14	19	19	$17,3 \pm 1,7$
	10 мкг/мл	16	15	21	$17,3 \pm 1,9$
Цикло фосфа мид + Алло- статин	1550 нг/мл + 0,1 мкг/мл	8	8	9	$8,7 \pm 0,3$
	1550 нг/мл + 1 мкг/мл	6	6	10	$7,3 \pm 1,3$
	1550 нг/мл + 10 мкг/мл	3	4	4	$3,7 \pm 0,3$

Таблица 5. Противовирусная активность препаратов аллостатин и аллоферон в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) на модели летальной гриппозной инфекции у белых мышей.

5

Препарат	Доза вируса, LD ₅₀	Смертность животных (пало/заражен о, шт.).	Процент гибели, %	Смертность по сумме двух доз вируса, %
Конт роль	30	10/10	100	90
	3	8/10	80	
Аллоф ерон	30	6/10	60	50**
	3	4/10	40	
Алло- статин	30	7/10	70	50**
	3	3/10	30	

** Вероятность отличия от контроля $P < 0,01$

Список используемой литературы

1. Н.И. Переводчикова Клиническая химиотерапия опухолевых заболеваний,
5 М., Медицина, 1976, с. 100-103
2. Zee et al., J. Clin. Oncol., 1998, 16, 8, p. 2834-2839
3. Aviles et al. Leuk. Lymphoma, 1998, 30,5-6, p. 651-656
4. Gilbert, Cancer, 1998, 83,6,p.1205-13
5. Rutledge, Chin and Schepartz Current Opinion in Chemical Biology, 2002, 6, p.
10 479-485
6. SK Narula, R Coffman, eds. New cytokines as potential drugs, Birkhauser
Verlag, Basel, 2000, 141 pp
7. Патент США N° 5231081
8. Патент России N° 2172322
9. Chernysh et al., Proceedings of National Academy of Science, 2002, 99, p.
15 12628-12632
- 10.Kourie, J.I. *Chem. Biol. Interact.*, 2001, 138, 1-26; Taylor, S.C., Green, K.N.,
Smith, I.F. & Peers, C. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2001, 281, 1850-1857
- 11.Mabbott, N.A., Brown, K.L., Manson, J. & Bruce, M.E. *Immunology*, 1997, 92,
20 p.161-165
- 12.Патент России N° 2172322

25

30

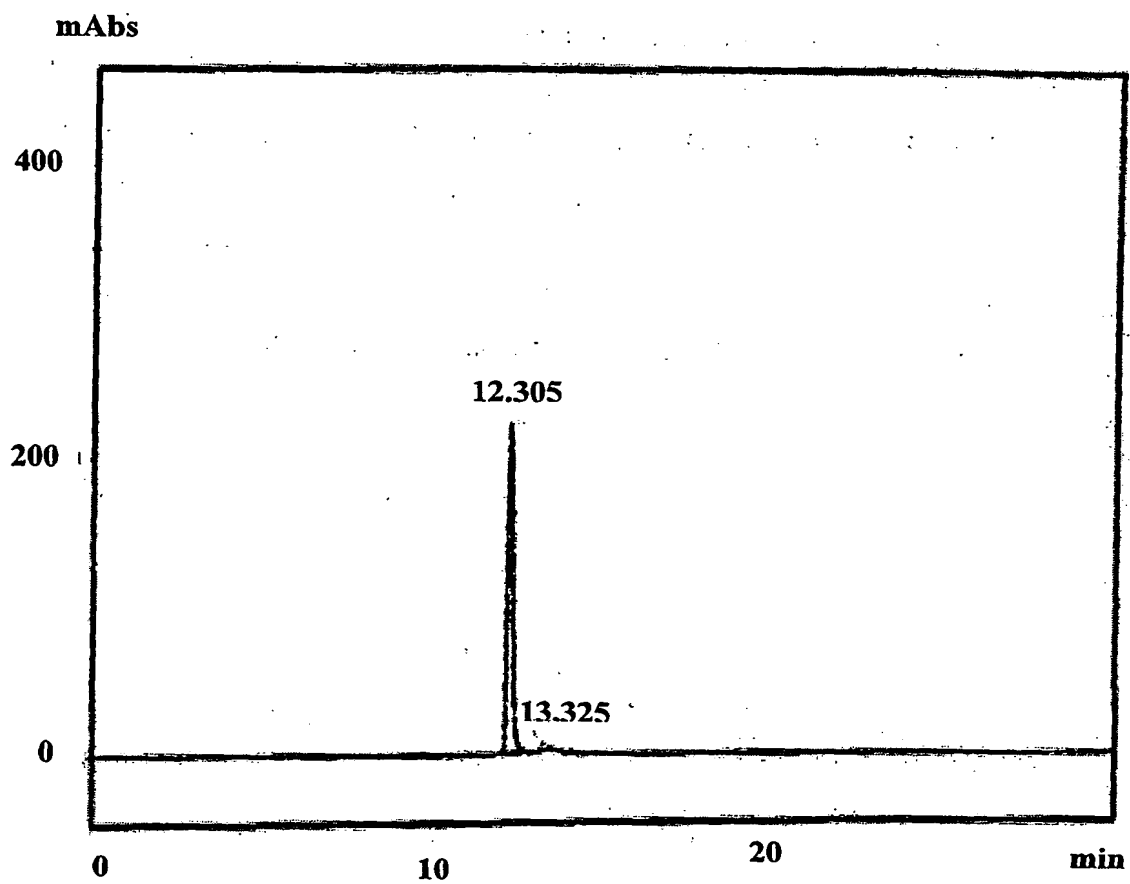
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептиды, характеризующиеся общей структурной формулой
X₁ Trp Gly Gln X₂
или их фармацевтически приемлемые соли, или эфиры, или амиды,
5 где X₁ отсутствует, либо содержит не менее 1 аминокислоты,
X₂ отсутствует, либо содержит не менее 1 аминокислоты.
2. Пептид по п. 1, содержащий до 30 аминокислотных остатков, предпочтительно 5-15 аминокислотных остатков
- 10 3. Пептид по пп. 1, где X₁ выбран из группы, содержащей 0 аминокислот, His-Gly-Val-Ser-Gly-, His-Gly-Gly-Gly-, His-Val-Gly-Gly-, His-Gly-Gly-Gly-Gly-, Gln-Gly-Gly-Gly-Gly- и His-Gly-Gly-Gly-
4. Пептид по пп. 1, где X₂ выбран из группы, содержащей 0 аминокислот,
-His-Gly-Thr-His -Gly, -Gly-Gly-Thr-His-Gly, -Pro-His-Val-Gly-Gly, -Pro-His-Gly-Gly-
15 Gly, -Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly, -Gly-Gly-Gly-Thr-His-Ser
5. Пептид по п. 1, выбранный из группы, содержащей
His-Gly-Val-Ser-Gly-Trp-Gly-Gln-His-Gly-Thr-His -Gly, His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly, His-Gly-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Gly-Gly-Thr-His-Gly, His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Val-Gly-Gly, His-Val-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly, Gln-Gly-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly, His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly -Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly, His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Gly-Gly-Gly-Thr-His-Ser
- 20 6. Белки и полипептиды, в состав которых входят аминокислотные последовательности по п. 1
7. Пептиды по п. 1, обладающие антипролиферативной и цитотоксической активностью
8. Пептиды по п. 1, обладающие противоопухолевой активностью
9. Пептиды по п. 1, обладающие антивирусной активностью
10. Пептиды по п. 1, обладающие иммуномодулирующей активностью
- 30 11. Белки и полипептиды по п. 6, обладающие противоопухолевой активностью
12. Белки и полипептиды по п. 6, обладающие антивирусной активностью
13. Белки и полипептиды по п. 6, обладающие иммуномодулирующей активностью
14. Химические соединения, не являющиеся природными пептидами или белками, обладающие антипролиферативной, цитотоксической, противоопухолевой или

антивирусной активностью, в состав которых входит аминокислотная последовательность, соответствующая п. 1

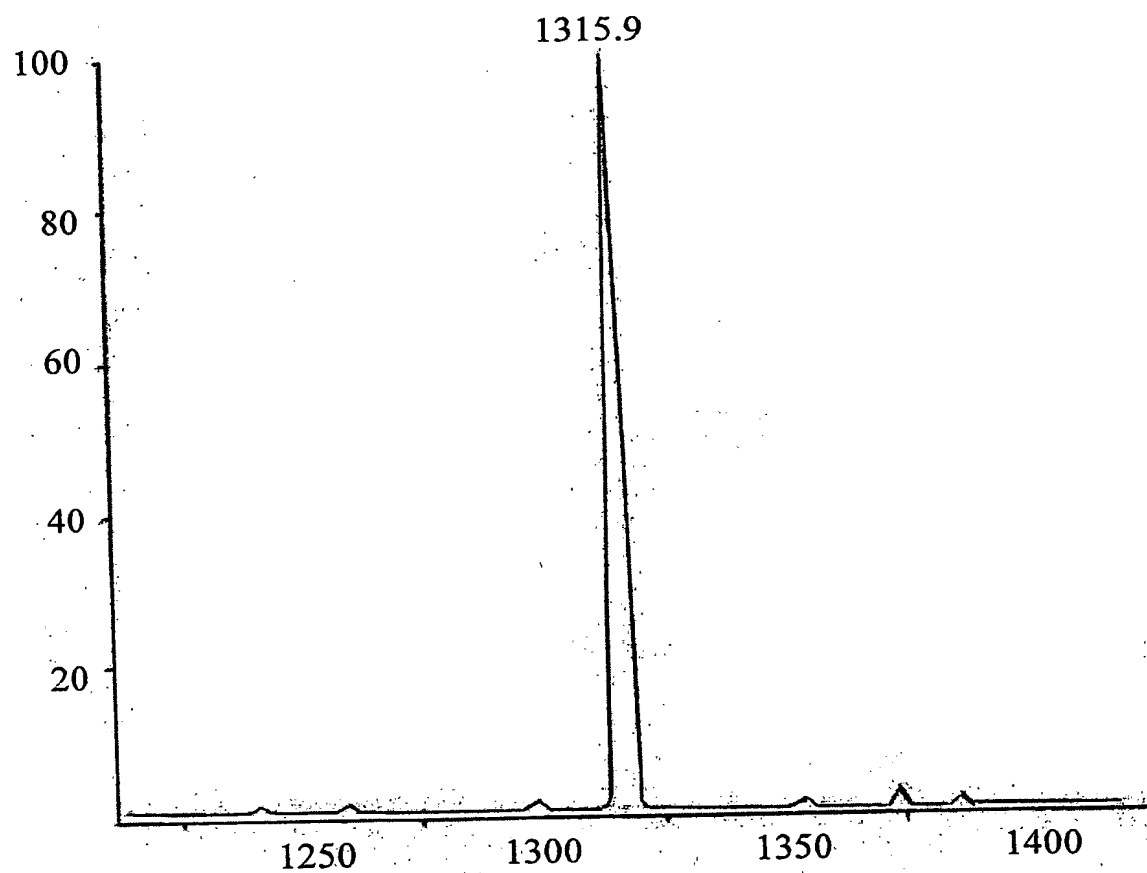
15. Фармацевтические композиции, включающие пептиды по п. 1
16. Фармацевтические композиции, включающие белки и полипептиды по п. 6
- 5 17. Фармацевтические композиции, включающие химические соединения по п. 14
18. Нуклеотидный сиквенс, кодирующий любой из пептидов по п. 1
19. Вектор, подходящий для экспрессии любого из пептидов по п. 1 в клетке-хозяине, которая экспрессирует этот пептид после трансформации, включая фрагмент ДНК, кодирующий пептид по п. 1
- 10 20. Клетка-хозяин, трансформированная вектором по п. 19

1/5



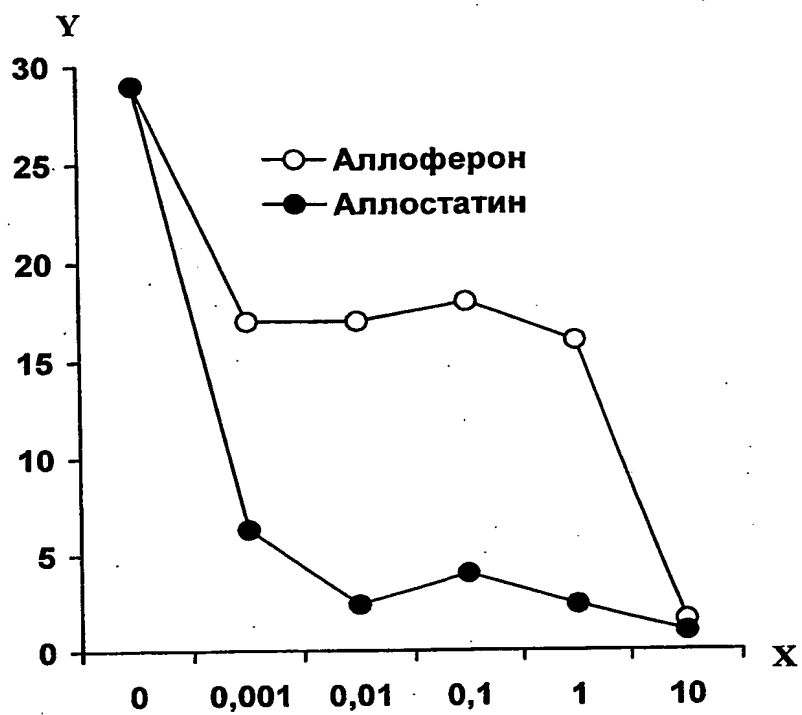
Фиг. 1

2/5



Фиг. 2

3/5

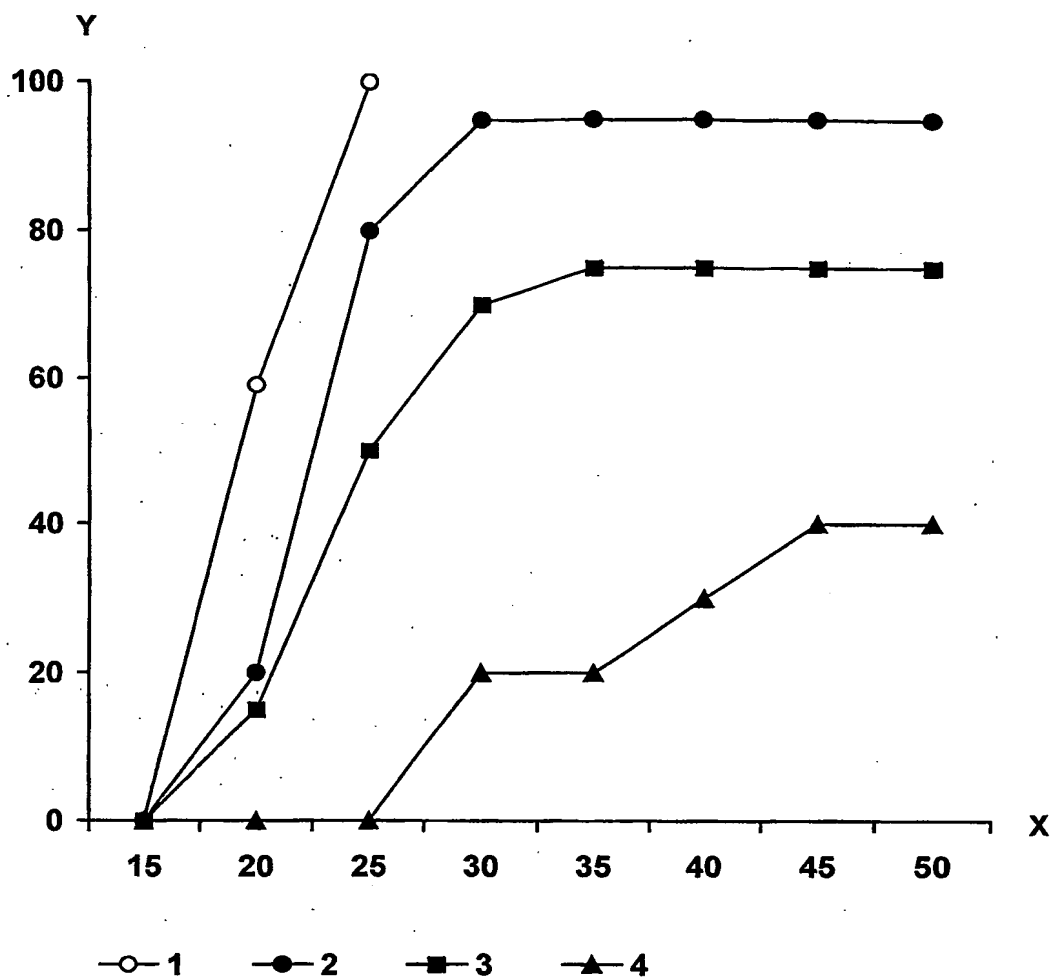


Фиг. 3

По оси X: мкг/мл

По оси Y: кратность роста популяции за 90 часов

4/5.



Фиг. 4

По оси X: дни после имплантации опухоли

По оси Y: % мышей с опухолями

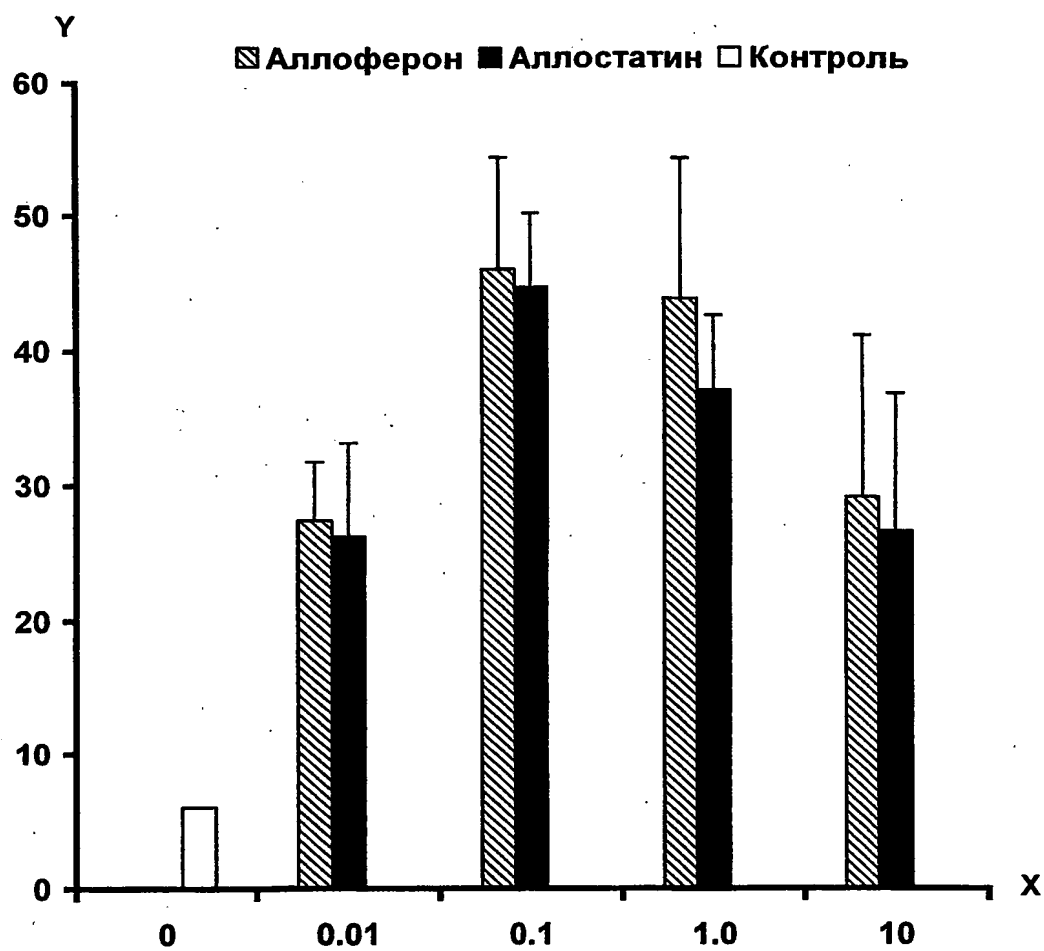
1 – контроль (n = 17)

2 – аллостати́н (n = 20)

3 – химиотерапия (n = 20)

4 – химиотерапия + аллостати́н (n = 20)

5/5



Фиг. 5

По оси X: мкг/мл

По оси Y: интерферон, МЕ/мл

Перечень последовательностей

- <110> Черныш Сергей Иванович; Chernysh Sergey Ivanovich
 <120> Противоопухолевые и антивирусные пептиды
 <160> 12
 5 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <223> Аллостатин 1
 <400> 1
 His Gly Val Ser Gly Trp Gly Gln His Gly Thr His Gly
 1 5 10
 15
 <210> 2
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Tragelaphus strepsiceros
 20 <220>
 <223> fragment AA 80-91 of Trast prion protein 1 precursor (PrP1 Trast)
 <308> Swissprot P40242
 <309> 1995-02-31
 <400> 2
 25 His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 264
 30 <212> PRT
 <213> Tragelaphus strepsiceros
 <220>
 <223> fragment AA 96-108 of Trast prion protein 1 precursor (PrP1 Trast)
 <308> Swissprot P40242
 35 <309> 1995-02-31

2

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Gly
1 5 10

<210> 4

5 <211> 256

<212> PRT

<213> Tragelaphus strepsiceros

<220>

<223> fragment AA 64-75 of Trast prion protein 2 precursor (PrP2 Trast)

10 <308> Swissprot P40243

<309> 1995-02-31

<400> 4

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Val Gly Gly

15 <210> 5

<211> 256

<212> PRT

<213> Tragelaphus strepsiceros

<220>

20 <223> fragment AA 72-83 of Trast prion protein 2 precursor (PrP2 Trast)

<308> Swissprot P40243

<309> 1995-02-31

<400> 5

Val Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly

25

<210> 6

<211> 256

<212> PRT

<213> Tragelaphus strepsiceros

30 <220>

<223> fragment AA 88-100 of Trast prion protein 2 precursor (PrP2 Trast)

<308> Swissprot P40243

<309> 1995-02-31

<400> 6

3

Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Gly

<210> 7

<211> 264

<212> PRT

5 <213> Bos taurus

<220>

<223> fragment AA 96 - 108 of Bovine prion protein 1 precursor (PrP bovin)

<308> Swissprot P10279

<309> 1989-03-10

10 <400> 7

Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Gly

<210> 8

<211> 264

15 <212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<223> fragment AA 64-75 of Bovine prion protein 1 precursor (PrP bovin)

<308> Swissprot P10279

20 <309> 1989-03-10

<400> 8

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly

<210> 9

25 <211> 253

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> fragment AA 52-66 of human prion protein precursor (PrP Human)

30 <308> Swissprot P04156

<309> 1986-11-03

<400> 9

Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly

4

<210> 10

<211> 253

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <220>

<223> fragment AA 69-83 of human prion protein precursor (PrP Human)

<308> Swissprot P04156

<309> 1986-11-03

<400> 10

10 His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly

<210> 11

<211> 253

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<223> fragment AA 85-97 of human prion protein precursor (PrP Human)

<308> Swissprot P04156

<309> 1986-11-03

20 <400> 11

His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Ser

<210> 12

<211> 13

25 <212> PRT

<213> Calliphora vicina

<220>

<223> Аллоферон 1

<310> RU 2172322 C1

30 <311> 1999-12-27

<312> 2001-08-20

<400> 12

His Gly Val Ser Gly His Gly Gln His Gly Val His Gly

1

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2004/000541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/06, 7/08, A61K 38/08, 38/10, 38/16, A61P 31/12, 35/00, 37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 7/06, 7/08, 14/00, A61K 38/08, 38/10, 38/16, A61P 31/12, 35/00, 37/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0668350 A1 (AKZO NOBEL N. V.) 23. 08. 1995, page 5, claims 5-7, 10-11, 22	1-2, 6-20
X	DE 19741607 A1 (PRIONICS AG) 25. 03. 1999, page 1, line 50, claims 3-10	1-2, 6-17
X	WO 2001/077687 A2 (V. I TECHNOLOGIES, INC.) 18. 10. 2001, page 1, paragraphs 2-3, claims 8-9	1-2, 6-14
X	US 5773572 A (PROTEUS MOLECULAR DESIGN LIMITED) 30. 06. 1998, column 1, claim 8	1-2, 6-14, 18-20
X	WO 1996/013590 A2 (INNOGENETICS N. V.) 09. 05. 1996, claim 5	1, 6-13, 15-16, 18-20
A	RU 2172322 C1 (CHERNYSH SERGEI IVANOVICH) 20.08.2001	1-5, 7-10, 15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
(18. 05. 2005)

Date of mailing of the international search report
(09. 06. 2005)

Name and mailing address of the ISA/

RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2004/000541

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 2. Claims 1 and 2
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplementary sheet

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2004/000541

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that that no meaningful international search can be carried out, specifically:

the indicated claims do not comply with the requirements of PCT Article 6 for clarity and conciseness; the range of protection sought for the indicated claims is so broad that it does not seem possible to cite all the relevant prior art documents (more than 9000); the search report therefore cites only some of the relevant references.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2004/000541

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07K 7/06, 7/08, A61K 38/08, 38/10, 38/16, A61P 31/12, 35/00, 37/02

Согласно Международной патентной классификации (МПК-7)

В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7:

C07K 7/06, 7/08, 14/00, A61K 38/08, 38/10, 38/16, A61P 31/12, 35/00, 37/02

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	EP 0668350 A1 (AKZO NOBEL N. V.) 23. 08. 1995, с. 5, формула п.п. 5-7, 10-11, 22	1-2, 6-20
X	DE 19741607 A1 (PRIONICS AG) 25. 03. 1999, с. 1, строка 50, формула п.п. 3, 10	1-2, 6-17
X	WO 2001/077687 A2 (V. I TECHNOLOGIES, INC.) 18. 10. 2001, с. 1, абз. 2-3, формула, п.п. 8-9	1-2, 6-14
X	US 5773572 A (PROTEUS MOLECULAR DESIGN LIMITED) 30. 06. 1998, кол. 1, формула п. 8	1-2, 6-14, 18-20
X	WO 1996/013590 A2 (INNOGENETICS N. V.) 09. 05. 1996, формула п. 5	1, 6-13, 15-16, 18-20
A	RU 2172322 C1 (ЧЕРНЫШ СЕРГЕЙ ИВАНОВИЧ) 20. 08. 2001	1-5, 7-10, 15

☒ последующие документы указаны в продолжении графы С.

☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылаемых документов:

A документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным

E более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее

L документ, подвергающий сомнению притязание (а) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылаемого документа, а также в других целях (как указано)

O документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.

P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

T более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение

X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности

Y документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста

& документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска: 18 мая 2005 (18. 05. 2005)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске:
09 июня 2005 (09. 06. 2005)

Наименование и адрес Международного поискового органа
Федеральный институт промышленной собственности

Уполномоченное лицо:

Т. Николаева

РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30,1 Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Телефон № 240-25-91

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(апрель 2005)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2004/000541

Графа II. Замечания для случая, когда некоторые пункты формулы не подлежат поиску (Продолжение пункта 2 первого листа)

Настоящий отчет о международном поиске не был подготовлен в отношении некоторых пунктов формулы в соответствии со статьей 17 (2) (а) по следующим причинам:

1. ☐ пункты №:
т.к. они относятся к объектам, по которым данный Международный поисковый орган не обязан проводить поиск, а именно:
2. ☒ пункты №: 1,2
т.к. они относятся к частям международной заявки, настолько не соответствующим установленным требованиям, что по ним нельзя провести полноценный международный поиск, а именно:
указанные пункты не соответствуют требованиям Статьи 6 в отношении ясности и краткости;
объем испрашиваемой охраны указанных пунктов столь велик, что не представляется возможным процитировать все релевантные документы подпадающие под заявленные притязания (более 9 тыс.);
поэтому в отчете о поиске приведена только часть релевантных документов.
3. ☐ пункты №:
т.к. они являются зависимыми пунктами и не составлены в соответствии со вторым и третьим предложениями Правила 6.4 (а).

Графа III. Замечания для случая несоблюдения единства изобретения (продолжение пункта 3 первого листа)

Настоящий международный поисковый орган обнаружил несколько групп изобретений в данной международной заявке, а именно:

1. ☐ Т.к. все необходимые дополнительные пошлины были уплачены своевременно, настоящий отчет о международном поиске охватывает все пункты формулы изобретения, по которым можно провести поиск.
2. ☐ Т.к. все пункты формулы, по которым можно провести поиск, могут быть рассмотрены без затрат, оправдывающих дополнительную пошлину, Международный поисковый орган не требовал оплаты дополнительной пошлины.
3. ☐ Т.к. только некоторые из требуемых дополнительных пошлин были уплачены заявителем своевременно, настоящий отчет о международном поиске охватывает лишь те пункты формулы, за которые была произведена оплата, а именно пункты №:
4. ☐ Необходимые дополнительные пошлины своевременно не были уплачены заявителем.
Следовательно, настоящий отчет о международном поиске ограничивается группой изобретений, упомянутой первой в формуле изобретения; а именно пункты №:

Замечания по возражению

- ☐ Уплата дополнительных пошлин за поиск сопровождалась возражением заявителя и, если применимо, уплатой пошлины за возражение.
- ☐ Уплата дополнительных пошлин за поиск сопровождалась возражением заявителя, но соответствующие пошлины за возражение не были уплачены в течении срока, указанного в предложении.
- ☐ Уплата дополнительных пошлин за поиск не сопровождалась возражением заявителя.